

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-323183

(43)Date of publication of application : 08.12.1998

(51)Int.Cl.

C12N 5/02
A61K 31/195
A61K 31/195
C12N 5/06

(21)Application number : 09-114548

(71)Applicant : OTSUKA PHARMACEUT FACTORY
INC

(22)Date of filing : 02.05.1997

(72)Inventor : NAITO SHINSAKU
KOBAYASHI MASARU
IGUCHI SEIICHIRO
NISHIMURA MASUHIRO

(30)Priority

Priority number : 09 71120 Priority date : 25.03.1997 Priority country : JP

(54) LIQUID FOR PROTECTING CELL

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a cell-protecting liquid enabling the existence of cells for long periods without causing the damages, injuries, etc., of the cells and useful as a tissue-washing liquid, an artificial cerebrospinal fluid, an intraocular perfusate, etc., by including N-acetylcysteine and N,N-diacetylcysteine.

SOLUTION: This cell-protecting liquid enabling the existence of cells for long periods without causing the damages, injuries, etc., of cells on contact with the cells is obtained by dissolving N-acetylcysteine and/or N,N-diacetylcysteine in a cell-protecting liquid in a concentration of 0.3-3 mM. An electrolyte solution containing the N-acetylcysteine and/or the N,N-diacetylcysteine and Mg²⁺ and/or Ca²⁺ or an electrolyte solution containing the N-acetylcysteine and/or the N,N-diacetylcysteine, glucose and Mg²⁺ and Ca²⁺ is preferably received in one chamber of a double chamber container, and an electrolyte solution containing HCO₃⁻ and/or PO₄³⁻ is received in the other chamber. The obtained cell-protecting liquid received in the double chamber container is used as a tissue-washing liquid, an artificial cerebrospinal fluid, a tissue perfusate, an intraocular perfusate, a tissue-storing liquid, etc.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 11.11.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-323183

(43) 公開日 平成10年(1998)12月8日

(51) Int.Cl. ⁹	識別記号	F I	
C 1 2 N 5/02		C 1 2 N 5/02	
A 6 1 K 31/195	ABL	A 6 1 K 31/195	ABL
	AGZ		AGZ
C 1 2 N 5/06		C 1 2 N 5/00	E
審査請求 未請求 請求項の数15 O L (全 6 頁)			

(21) 出願番号	特願平9-114548	(71) 出願人	000149435 株式会社大塚製薬工場 徳島県鳴門市撫養町立岩字芥原115
(22) 出願日	平成9年(1997)5月2日	(72) 発明者	内藤 真策 徳島県徳島市川内町加賀須野1076-39
(31) 優先権主張番号	特願平9-71120	(72) 発明者	小林 勝 徳島県鳴門市里浦町里浦字花面571
(32) 優先日	平9(1997)3月25日	(72) 発明者	井口 誠一郎 徳島県鳴門市撫養町畜田字浜端西87-5
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(72) 発明者	西村 益浩 徳島県鳴門市撫養町北浜字宮の東65-12
		(74) 代理人	弁理士 三枝 英二 (外4名)

(54) 【発明の名称】 細胞保護液

(57) 【要約】

【課題】細胞との接触により障害、損傷等を惹起させず、長期生存を可能とする細胞保護液、特に複室容器に収容された形態の細胞保護液を提供。

【解決手段】N-アセチルシステイン及び／又はN、N-ジアセチルシスチンを含有する、組織洗浄液、人工髄液、眼内灌流液等の細胞保護液、特に複室容器に収容された上記細胞保護液。

1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 N-アセチルシステイン及び／又はN、N-ジアセチルシスチンを含有することを特徴とする細胞保護液。

【請求項 2】 組織洗浄液である請求項 1 に記載の細胞保護液。

【請求項 3】 人工髄液である請求項 1 に記載の細胞保護液。

【請求項 4】 組織灌流液である請求項 1 に記載の細胞保護液。

【請求項 5】 眼内灌流液である請求項 1 に記載の細胞保護液。

【請求項 6】 組織保存液である請求項 1 に記載の細胞保護液。

【請求項 7】 一室にブドウ糖が収容され、他室に HCO_3^- 及び／又は PO_4^{3-} を含む電解質液が収容されてなる複室容器の上記一室及び他室の少なくとも一室に更にN-アセチルシステイン及び／又はN、N-ジアセチルシスチンが収容されてなることを特徴とする請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の細胞保護液。

【請求項 8】 複室容器の一室及び他室にそれぞれN-アセチルシステイン及び／又はN、N-ジアセチルシスチンが収容されてなる請求項 7 に記載の細胞保護液。

【請求項 9】 複室容器の一室にN-アセチルシステイン及び／又はN、N-ジアセチルシスチン、 Mg^{2+} 及び Ca^{2+} を含む電解質液又はN-アセチルシステイン及び／又はN、N-ジアセチルシスチン、ブドウ糖、 Mg^{2+} 及び Ca^{2+} を含む電解質液が収容され、他室に HCO_3^- 及び／又は PO_4^{3-} を含む電解質液が収容されてなる請求項 2 ～ 7 のいずれかに記載の細胞保護液。

【請求項 10】 複室容器の他室に更にN-アセチルシステイン及び／又はN、N-ジアセチルシスチンが収容されてなる請求項 9 に記載の細胞保護液。

【請求項 11】 複室容器の一室にブドウ糖、 Mg^{2+} 及び Ca^{2+} を含む電解質液が収容され、他室にN-アセチルシステイン及び／又はN、N-ジアセチルシスチンと共に HCO_3^- 及び／又は PO_4^{3-} を含む電解質液が収容されてなる請求項 2 ～ 7 のいずれかに記載の細胞保護液。

【請求項 12】 複室容器の一室に更にN-アセチルシステイン及び／又はN、N-ジアセチルシスチンが収容されてなる請求項 11 に記載の細胞保護液。

【請求項 13】 N-アセチルシステイン及び／又はN、N-ジアセチルシスチンが細胞保護液中に0.1 ～ 10 mMの濃度範囲で含有される請求項 1 ～ 12 のいずれかに記載の細胞保護液。

【請求項 14】 N-アセチルシステイン及び／又はN、N-ジアセチルシスチンが細胞保護液中に0.2 ～ 5 mMの濃度範囲で含有される請求項 1 ～ 12 のいずれかに記載の細胞保護液。

2

【請求項 15】 N-アセチルシステイン及び／又はN、N-ジアセチルシスチンが細胞保護液中に0.3 ～ 3 mMの濃度範囲で含有される請求項 1 ～ 12 のいずれかに記載の細胞保護液。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は細胞保護液、即ち例えば組織洗浄液、人工髄液、組織灌流液、眼内灌流液等の細胞と直接接点させて利用される液であって且つこの接触によっても、該細胞に障害、損傷等を殆ど惹起させることなく、長期生存を可能とする新しい細胞保護のための細胞保護液に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、臓器移植等において臓器の保存技術は著しい進歩を遂げてきた。臓器保存液の分野においても種々の研究、改善がなされてきており、例えば、リンゲル液、コリンズ液、ユーロコリンズ液〔「移植」第22巻第3号第185頁、1987年〕、UW液〔特開平1-246201号公報〕、PFC乳液と改変リンゲル液とヒト血清アルブミンとからなる混合液〔特開昭55-51016号公報〕等が開発、提案されている。

【0003】また、人工髄液や組織灌流液等の分野においても、例えば「注射用人工髄液の製造法」〔特開昭50-82224号公報〕、「眼内灌流液」〔特開平7-97331号公報〕、「人工房水の製造法」〔特開昭56-86115号公報〕等の各種の研究、改良が試みられている。

【0004】しかしながら、細胞外液と同一組成の薬液を人工的に製造することは、現在不可能であり、上記開発、提案されている各種の保存液等は、いずれもその利用時に、これと接触する細胞に細胞障害を惹起させ、その結果、細胞を損傷させて比較的速やかに死滅させるという致命的欠点を有している。

【0005】従って、之等の臓器保存液、人工髄液、組織灌流液等の分野においては、細胞障害のより少ない細胞保護液の開発、提供が要望されている。

【0006】更に、眼内灌流液の分野では、現在、「ビーエスエスプラス」〔商品名、輸入販売元：参天製薬株式会社〕が市販されており、これは内容25ml程度のガラス瓶にオキシグルタチオンとブドウ糖との混合溶液20mlを収容したものと、内容600ml程度のガラス瓶に HCO_3^- を含む電解質液480mlを収容したものとを組み合わせた所謂組合せ剤の形態をとっている。このため、該眼内灌流液は、その使用時に2液を混合溶解する必要があり、この作業が煩雑であるに加えて、この混合溶解時に薬液汚染の危険がある欠点もある。

【0007】尚、上記眼内灌流液とは技術分野を異にするが、輸液分野においては、上記の如き2種以上の薬液の混合溶解時の煩雑さや汚染等の問題を解消する手段として、柔軟性を有するプラスチック容器本体に適宜連通

可能な仕切手段を設けたもの、例えば弱シールにより複数室に区画してなる複室容器（所謂ダブルバッグ）が開発されている。これによれば、使用時にいずれかの室を手で押す等の簡単な押圧操作を行なうだけで両室を隔てている弱シール部が破壊されて両室が連通され、汚染等の危険を伴うことなく各室に収容された薬液を混合できる。

【0008】しかしながら、上記ピーエスエスプラスの場合、かかるダブルバッグを利用して、その一室にオキシグルタチオンとブドウ糖との混合液を収容し、他室に電解質液を収容することはできない。なぜなら、このものでは加熱滅菌時にオキシグルタチオンとブドウ糖とがメイラード反応によって結合して薬液を褐色とする褐変現象が生じるからである。

【0009】このメイラード反応を防止するために、オキシグルタチオン溶液とブドウ糖溶液とを別々の室に収容する、即ち、オキシグルタチオンかブドウ糖のいずれか一方を電解質液と同室に収容することも考えられるが、前二者はいずれもpHが7以下で安定であり、かかるpHを設定する必要があるのに対して、後者の電解質液は HCO_3^- 及び／又は PO_4^{3-} を含み、pHを7.4程度として混合使用時に生理的なpHとなるようにする必要があり、この点より上記各液を別々の室に収容することは液のpH面より不可能である。

【0010】このように、ピーエスエスプラスは、現在も組合せ剤からその剤形を変更できず、前述した混合操作の煩雑さ、薬液汚染の問題を解消できない不利があり、かかる眼内灌流液の分野において上記組合せ剤の欠点を改良する技術の開発が望まれている。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、上記従来の細胞保護液に認められる欠点を悉く解消した、改良された細胞保護液を提供することにある。

【0012】本発明者らは上記目的より鋭意研究を重ねた結果、従来のこの種細胞保護液中にN-アセチルシステイン及び／又はN、N-ジアセチルシスチンを添加配合する場合には、該液との接触による細胞の障害の程度が著しく低減されることを見出した。また、本発明者らは、眼内灌流液に上記N-アセチルシステイン及び／又はN、N-ジアセチルシスチンの添加配合を応用するときには、得られる液はダブルバッグに収容しても公知の眼内灌流液に見られる如き前述した欠点を認められないことも見出した。本発明は、之等の知見に基づいて完成されたものである。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明によれば、N-アセチルシステイン（以下「NAC」という）及び／又はN、N-ジアセチルシスチン（以下之等を「NAC類」という）を含有することを特徴とする細胞保護液、特に組織洗浄液、人工髄液、組織灌流液、眼内灌流液、組織

保存液等の細胞保護液が提供される。

【0014】また本発明によれば、(1)一室にブドウ糖が収容され、他室に HCO_3^- 及び／又は PO_4^{3-} を含む電解質液が収容されてなる複室容器の上記一室及び他室の少なくとも一室に更にNAC類が収容されてなることを特徴とする細胞保護液、(2)複室容器の上記一室及び他室にそれぞれNAC類が収容されてなる上記細胞保護液、(3)複室容器の一室にNAC類、 Mg^{2+} 及び Ca^{2+} を含む電解質液又はNAC類、ブドウ糖、 Mg^{2+} 及び Ca^{2+} を含む電解質液が収容され、他室に HCO_3^- 及び／又は PO_4^{3-} を含む電解質液が収容されてなる細胞保護液、(4)複室容器の他室に更にNAC類が収容されてなる上記(3)の細胞保護液、(5)複室容器の一室にブドウ糖、 Mg^{2+} 及び Ca^{2+} を含む電解質液が収容され、他室にNAC類と共に HCO_3^- 及び／又は PO_4^{3-} を含む電解質液が収容されてなる細胞保護液、及び(6)複室容器の一室に更にNAC類が収容されてなる上記(5)の細胞保護液が提供される。

【0015】本発明細胞保護液は、細胞との直接接触によっても、該細胞に障害、損傷等を殆ど惹起させず、従来のこの種の液に見られる重大な欠点である細胞障害作用を見事に防止乃至抑制したものであり、細胞の長期生存を可能とする新しい薬液として各種の分野で有効である。殊に、本発明により提供される複室容器に収容された形態の細胞保護液は、混合操作の煩雑さや薬液汚染の問題を解消した新しい薬液として、特に眼内灌流液の分野で有効である。

【0016】

【発明の実施の形態】本発明細胞保護液には、細胞と直接接触する形態で用いられる各種の液が含まれる。その代表例としては、組織洗浄液、人工髄液、組織灌流液、眼内灌流液、組織保存液等を例示できる。

【0017】本発明では、かかる従来から知られている各種細胞保護液中にNAC類を添加配合することを必須とし、これに基づいて本発明所期の効果を奏し得る。上記本発明細胞保護液中に添加配合されるNAC類は、細胞保護液中に0.1～10mMの濃度となる範囲で含有されるのがよく、好ましくは0.2～5mM、より好ましくは0.3～3mMの濃度となる範囲で含有されるのがよい。

【0018】本発明細胞保護液は、上記NAC類の添加配合を除いては、従来の各種細胞保護液と同様にして、種々の成分を用いて通常の方法により調製できる。例えば組織洗浄液や組織灌流液の場合は、主に生理食塩水、リンゲル液等を用い、適当な電解質、例えば HCO_3^- や PO_4^{3-} 等を含む電解質を加え、之等上記NAC類の所定量を添加配合して調製される。上記各液組成の代表例としては、生理食塩水溶液では、 $\text{Na}^+154\text{mEq/l}$ 及び $\text{Cl}^-154\text{mEq/l}$ を、乳酸リンゲル液では、 $\text{Na}^+130\text{mEq/l}$ 、 $\text{K}^+4\text{mEq/l}$ 、 Ca^+

10

20

30

40

50

3 mEq/l、Cl⁻ 109 mEq/l 及び Lactate⁻ 28 mEq/l を例示することができる。

【0019】人工髄液としても、公知の各種のもの、例えば下記組成のエリオットB液 (Elliott B) の処方を利用することができ、本発明人工髄液は、之等の処方に更に所定量のNAC類を添加配合し、また必要に応じてブドウ糖 (グルコース) を添加して、調製される。

【0020】

Na ⁺ (mEq/l)	149
K ⁺ (mEq/l)	4.0
Mg ²⁺ (mEq/l)	2.4
Ca ²⁺ (mEq/l)	2.7
Cl ⁻ (mEq/l)	132
HCO ₃ ⁻ (mEq/l)	22.6
P (mEq/l)	1.5
グルコース (mg/dl)	80
pH	7.0~7.4

上記人工髄液や眼内灌流液の場合には、またブドウ糖とHCO₃⁻やPO₄³⁻を別々の容器に収容し、そのいずれか又は両者にNAC類を収容して2液型として調製することもできる。この場合、更に必要に応じてブドウ糖を収容した容器中にMg²⁺やCa²⁺を添加収容させてもよい。

【0021】本発明細胞保護液が眼内灌流液の場合は、特に現在輸液容器として実用されているダブルバッグを利用して、これに本発明保護液を充填した形態に調製することもできる。この場合、ダブルバッグの一室にブドウ糖を収容し、他室にHCO₃⁻及び/又はPO₄³⁻を含む電解質液を収容し、NAC類をその少なくとも一室に*

炭酸水素ナトリウム	2.52 g
リン酸一水素ナトリウム	0.42 g
塩化ナトリウム	7.08 g
塩化カリウム	0.38 g
塩化マグネシウム・6水塩	0.20 g
塩化カルシウム・2水塩	0.15 g
グルコース	0.92 g
NAC	0.049 g (0.3 mM)

【0028】

【実施例2】眼内灌流液の調製

ダブルバッグの下室 (口部を有する室) に下記各成分を含む下室液350 ml を、また上室 (口部を有さない ※

下室液 (350 ml)	
炭酸水素ナトリウム	1.26 g
リン酸一水素ナトリウム	0.21 g
塩化ナトリウム	3.54 g
塩化カリウム	0.19 g
上室液 (150 ml)	
塩化マグネシウム・6水塩	0.10 g
塩化カルシウム・2水塩	0.075 g
グルコース	0.46 g

* 収容する。

【0022】殊に、本発明に利用するNAC類は、システイン又はシスチンがアセチル化されたものであるため、従来用いられているオキシグルタチオンとは異なっており、ブドウ糖と同じ室に収容して滅菌してもメイラード反応を起こす危険はなく、またpHが7.4程度の電解質と同室に収容しても、pHが7以下でしか安定でない上記オキシグルタチオンとは異なっており、pHが8程度までは安定であるため、分解等を起こす危険もない利点がある。更に、上記眼内灌流液には必要に応じて、常法に従ってMg²⁺やCa²⁺を、ブドウ糖を収容した室に添加配合することができる。

【0023】このように、本発明細胞保護液は、眼内灌流液として調製される場合、従来この分野では達成できなかった複室容器への収容が可能となり、これによって、2種以上の液の混合溶解の煩雑さや薬液汚染の問題を全て解消できる利点がある。

【0024】かくして調製される本発明細胞保護液は、従来のこの種液と同様にして、各種の細胞と接触する用途に利用される。

【0025】

【実施例】以下、本発明の実施例及び試験例を示すが本発明は之等に限定されるものではない。

【0026】

【実施例1】眼内灌流液の調製

薬液1リットル中に下記各成分を含む眼内灌流液を、次の処方 (各成分の混合) により調製した。

【0027】

※室) に下記各成分からなる上室液150 ml を充填してなる眼内灌流液を次の通り調製した。

【0029】

NAC

0.025g (0.3mM)

即ち、炭酸水素ナトリウム360g、リン酸一水素ナトリウム60g、塩化ナトリウム1011g及び塩化カリウム54.3gに注射用水に加えて之等を溶解して下室液100リットルを調製した。この液に炭酸ガスを吹き込みpHを7.2に調整し、メンブランフィルター（日本ボール社、孔径0.2μm）で濾過し、ポリエチレン製ダブルバッグの下室に350ml充填し、閉塞した。

【0030】別途、注射用水を煮沸後、窒素ガス雰囲気下で冷却した液80リットルに、塩化カルシウム・2水塩50g、塩化マグネシウム・6水塩66.7g、グルコース306.7g及びNAC16.3gを溶解させた後、更に注射用水を加えて100リットルとして上室液を調製した。この液を窒素ガス雰囲気中でメンブランフィルター（日本ボール社、孔径0.2μm）で濾過し、*

炭酸水素ナトリウム	1.94g
リン酸二水素カリウム	0.15g
塩化ナトリウム	7.15g
塩化カリウム	0.13g
塩化マグネシウム・6水塩	0.22g
塩化カルシウム・2水塩	0.17g
グルコース	0.61g
NAC	0.049g (0.3mM)

【0034】

【実施例4】人工髄液の調製

ダブルバッグの下室（口部を有する室）に下記各成分を含む下室液700mlを、また上室（口部を有さない）※

下室液（700ml）

炭酸水素ナトリウム	1.94g
リン酸二水素カリウム	0.15g
塩化ナトリウム	7.15g
塩化カリウム	0.13g

上室液（300ml）

塩化マグネシウム・6水塩	0.22g
塩化カルシウム・2水塩	0.17g
グルコース	0.61g
NAC	0.049g (0.3mM)

【0036】

【試験例1】NACの細胞保護効果試験

(1) 試験方法

ヒト正常アストロサイト（CCK-2565、岩城硝子株式会社、以下単に「アストロサイト」という）は、胎児を起源とした神経細胞であり、入手時の生細胞比率は75～82%（人種及び性別不明の21～22週胎児由来）であった。本試験は、アストロサイト細胞種、専用培地及び専用継代用試薬のキット（いずれも岩城硝子株式会社製）を用い、継代培養したアストロサイトを組織培養用マイクロプレート（岩城硝子株式会社）に移して試験に供した。

【0037】アストロサイトは、エネルギー源としてブ

* 先に下室液を充填済みのダブルバッグの上室に150ml充填し、空間部を窒素ガスで置換した後、閉塞した。

【0031】かくして、薬液充填済みのダブルバッグを窒素ガス中で、熱水シャワー滅菌した後、延伸ナイロン、ポリビニルアルコール及びポリエチレンのラミネートフィルムからなる袋に、炭酸ガスと窒素ガスとの混合ガスと酸素吸収剤（三菱ガス化学社、「エージレス」）と共に封入して、眼内灌流液収容ダブルバッグ製品を得た。

【0032】

【実施例3】人工髄液の調製

薬液1リットル中に下記各成分を含む人工髄液を、次の処方（各成分の混合）により調製した。

【0033】

※室）に下記各成分からなる上室液300mlを充填してなる人工髄液製品を、実施例2と同様にして調製した。

【0035】

ドウ糖を盛んに取り込んでおり、この生理活性が細胞保護効果の指標となるが、ブドウ糖は代謝分解されて細胞外に排出されるため、該ブドウ糖と同様に細胞内に取り込まれるものの、代謝分解を受けずに細胞内に滞留し、細胞の生理活性を定量的に検出できるデオキシ-D-グルコースのトリチウム標識体を指標として本試験に利用し、その放射活性測定を行なった。

【0038】眼内灌流液が用時に細胞表面に直接適用されることを考慮して、生理食塩液を対照として、0.1～1.0mMのNACの生理食塩溶液を、37℃の恒温培養条件でアストロサイトに3時間暴露させた。

【0039】尚、この処置はアストロサイトを培養している専用培地をNAC試験液と置換する手法を採用して

実施した。この暴露直後に、又はその後に元の培地に戻して24時間の培養を行なった後に、終濃度が74kBq/mlになるようにトリチウム標識デオキシ-D-グルコース(259GBq/mmol)を含むアストロサイト専用培地を添加して1時間細胞を培養し、培養細胞を可溶化して放射能を測定した。

【0040】試験結果は、試験期間をアストロサイト専用培地で培養した対照実験の測定値を100%とした相*

* 対値を算出し、これを得られるブドウ糖取り込み量変化として判定した。

【0041】(2) 結果

得られた結果(%, n=3、平均±SD)を下記表1に示す。

【0042】

【表1】

NAC濃度(mM)	暴 露 直 後	24時間後
0(対 照)	23 ± 6	33 ± 9
0.1	29 ± 2	37 ± 12
0.3	34 ± 7	40 ± 18
1	41 ± 10	51 ± 17
3	58 ± 8	72 ± 22
10	70 ± 20	59 ± 1

【0043】表1より、アストロサイトのブドウ糖取り込み活性は、生理食塩液による暴露直後の測定で、正常培養の23%に低下(24時間後では33%に低下)し、細胞死を含む細胞障害が惹起されているものと推定されたが、0.1mMのNACの添加によれば、上記活性が弱いながらも上昇(暴露直後29%、24時間後3

7%)し、これはNACの用量の増加に相関して上昇した。このことから、NACは、生理食塩水に起因する細胞障害に対して、細胞保護効果を奏することが確認された。また、NACの上記細胞保護効果は、24時間後の結果の方が良好なことから、一時的なものではなく、永続的なものであることも確認された。